

土壤过氧化氢酶（Solid-Catalase, S-CAT）试剂盒说明书

(货号: BP10125F 分光法 48 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

土壤过氧化氢酶主要分解土壤中的过氧化氢,降低土壤中过度累积的过氧化氢对植物根系的危害。本试剂盒提供一种简单,灵敏,快速的测定方法,即 CAT 催化过氧化氢产生水与氧气,剩余的过氧化氢与一种高灵敏显色探针反应生成有色物质,其在 510nm 左右有最大吸收峰。通过过氧化氢的减少量来计算土壤中 CAT 酶的活力。

本试剂盒突出特点是从紫外波长(240nm:过氧化氢的检测波长)转换到可见波长(510nm)检测,无需使用石英比色皿或 UV 板。而且由于过氧化氢极其不稳定,直接检测造成读值不稳定,且蛋白质等组分在此紫外波长下也有光吸收,影响结果精确性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 1 支	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部(可手动甩一甩); 2. 取出 25μL 至新的 EP 管中,再加 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 12mL×1 瓶	室温	1. 使用前混匀几下; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 16mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲,则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验,熟悉操作流程,根据预实验结果确定或调整样本浓度,以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

取新鲜土样风干或者 37 度烘箱风干,先粗研磨,过 40 目筛网,备用。

[注]:土壤风干,减少土壤中水分对于实验的干扰;;土壤过筛,保证取样的均匀细腻;

2、检测步骤:

① 分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 510nm,蒸馏水调零。

② 试剂一事先按照试剂配制要求配制好,再进行以下操作。

[建议]:若一次性样本较多,离心数量有限,可分批操作,待一批样本加完试剂二开始离心时,再进行下一批操作(土壤样本可一次性称完,分批按照加样表操作)。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	无基质管	无土管 (仅做一次)
土样 (g)	0.1	0.1	
蒸馏水	800	800	800
室温 (25℃) 震荡 (如：摇床) 培养 30min,			
试剂一	100	0	100
蒸馏水	0	100	
混匀，室温 (25℃) 10min (务必每隔 2min 摇晃一次)。			
试剂二	100	100	100
12000rpm, 4℃或室温离心 10min, 上清液务必全部转移至新的 EP 管中，待测。			

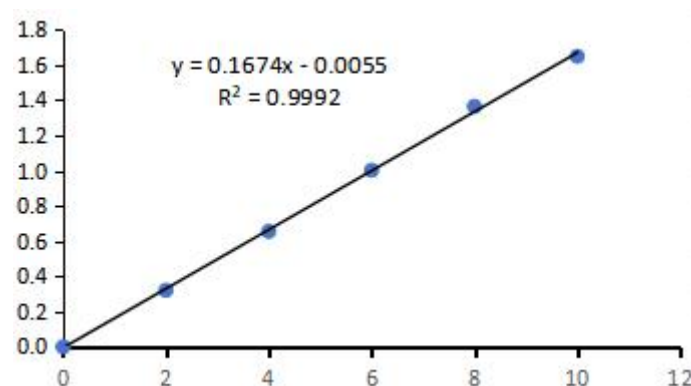
④ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

上清液	25	25	25
试剂三	825	825	825
试剂四	150	150	150
室温 (25℃) 静置 3min, 全部转移到 1mL 的玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，务必立即在 510nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{无土管}} - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{无基质管}})$ 。			

- 【注】：** 1. 无土管的颜色最深 (若无土管的值超过 2, 可对试剂一用蒸馏水适当稀释后再使用)，若测定管颜色很浅接近无色，说明样本里面过氧化氢酶含量很高，则反应 10min 的时间缩短 (如 5min) 或减少土壤取样质量 W。则改变后的 T 和 W 重新代入公式计算。
2. 若一次性检测样本较多，在显色反应阶段可酌情分批操作和读值，为保证数据的精确性，显色反应阶段最好半个小时内完成。

五、结果计算：

- 1、标准曲线： $y = 0.1674x - 0.0055$; x 为标准品摩尔质量 (μmol)，y 为 ΔA 。



- 2、单位定义：每小时每克土样催化 1μmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$S-CAT(\mu\text{mol/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0055) \div 0.1674] \div W \div T = 35.8 \times (\Delta A + 0.0055) \div W$$

T---反应时间，10 min=1/6h;

W---土壤样本实际取样量，g。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品母液浓度为 $100\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 20, 40, 60, 80, $100\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	20	40	60	80	100
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据无土管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线；标准品的摩尔质量作为横坐标，吸光值作为纵坐标。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	100	
蒸馏水	800	900
混匀，室温 (25°C) 10min (务必每隔 2min 摇晃一次)。		
试剂二	100	100
上清液待测。		

显色反应：在 EP 管中依次加入：

上清液	25	25
试剂三	825	825
试剂四	150	150
室温 (25°C) 静置 3min，全部转移到 1mL 的玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，务必立即在 510nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		

参考文献：

- 1、Trasar-Cepeda, C., F. Camiña, M.C. Leirós, and F. Gil-Sotres. 1999. An improved method to measure catalase activity in soils. Soil Biol. Biochem. 31:483-485
- 2、Holz, F. 1986. Automatisierte, photometrische Bestimmung der Aktivität von Bodenenzymen durch Anwendung (enzymatisch)-oxidativer Kupplungsreaktionen im Durchfluß. I. Mitteilung: Die Bestimmung der Katalaseaktivität. Landwirtsch. Forsch. 39:139-153.